

533,067

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Mai 2004 (06.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/038483 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G02B 21/00**

Rd., Kitchener, Ontario N2P 2A2 (CA). **VÖLCKER, Martin** [DE/DE]; Obere Karspüle 43, 37073 Göttingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011927

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Oktober 2003 (28.10.2003)

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BECK, Bernard**; Carl Zeiss Jean GmbH, Zentralbereich Recht und Patente, Patentabteilung, 07740 Jena (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
102 50 568.3 28. Oktober 2002 (28.10.2002) DE

Veröffentlicht:

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CARL ZEISS JENA GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Promenade 10, 007745 Jena (DE).

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

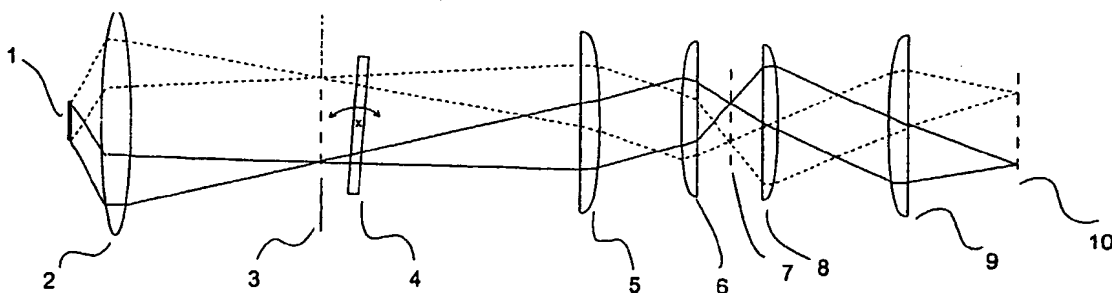
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BACKS, Bernhard** [DE/DE]; Uhländstrasse 44, 85386 Eching (DE). **SCHÄFER, Jörg** [DE/DE]; Himmelstiege 15, 37085 Göttingen (DE). **SCHÄFER, Lutz** [DE/CA]; 16-715 Doon Village

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING DEPTH DISCRIMINATION IN OPTICAL REPRODUCTION SYSTEMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BERBESSERUNG DER TIEFENDISKRIMINIERUNG OPTISCH ABBILDENDER SYSTEME



(57) Abstract: The invention concerns a method for improving depth discrimination in optical reproduction systems, said method being particularly useful in optical microscopy for enhancing the image quality when examining three-dimensional elongated objects. The invention concerns in particular the method of structured illumination such as disclosed in WO 97/6509. The invention is characterized in that it consists in determining the influence exerted by the variations of luminosity of the light source and the discoloration of the object in the case of a fluorescent illumination, said factors being taken into consideration when calculating the structure of the object.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Tiefendiskriminierung optisch abbildender Systeme. Es ist insbesondere in der Lichtmikroskopie anwendbar, um eine Erhöhung der Bildqualität bei der Untersuchung dreidimensional ausgedehnter Objekte zu erreichen. Sie ist anwendbar beim Verfahren der strukturierten Beleuchtung wie es in WO 97/6509 beschrieben ist. Dazu werden Einflüsse durch Helligkeitsschwankungen der Lichtquelle, der Positionierung der abgebildeten periodischen Struktur und Ausbleichen des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung ermittelt und bei der Berechnung der Objektstruktur berücksichtigt.

WO 2004/038483 A1

Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optisch abbildender Systeme

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Tiefendiskriminierung optisch abbildender Systeme. Es ist insbesondere in der Lichtmikroskopie anwendbar um eine Erhöhung der Bildqualität
5 bei der Untersuchung dreidimensional ausgedehnter Objekte zu erreichen.

In der klassischen Lichtmikroskopie besteht bei der Untersuchung dreidimensional ausgedehnter Objekte, d.h. von Objekten, deren Ausdehnung entlang der optischen Achse größer ist als die Tiefenschärfe der verwendeten Objektive, das Problem, dass das scharfe
10 Bild aus dem Fokusbereich mit außerfokalen Bildanteilen, welche demzufolge unscharf abgebildet werden, überlagert ist.

Um dieses Problem zu überwinden ist die Nutzung der konfokalen Abbildung bekannt, bei der mittels eines sogenannten Pinholes das aus dem nicht im Fokus liegenden Bereich stammende Licht ausgeblendet wird und somit nicht zur Abbildung beiträgt. Auf diese Weise
15 entsteht ein sogenannter optischer Schnitt. Diese konfokale punktweise Abbildung erfordert das Abrastern des Objektes in der Bildebene um ein Bild zu erhalten. Diese Abtastung kann entweder mittels Scannern in Laser Scanning Mikroskopen oder mittels Nipkow-Scheiben erfolgen.

Durch Aufnahme mehrerer optischer Schnittbilder in verschiedenen Fokuslagen kann ein „z-
20 Stapel“ gewonnen werden, welcher eine dreidimensionale Darstellung des Objektes ermöglicht.

Ein anderer Weg zur Erzeugung optischer Schnitte ist die Anwendung der strukturierten Beleuchtung. Diese wurde erstmals von Meir Ben-Levy und Eyal Pelec in WO 97/6509
25 angegeben. Verbesserungen und Erweiterungen dieser Methode wurden von Tony Wilson et al. in WO 98/45745 und von Volker Gerstner et al. in WO 02/12945 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser drei Schriften wird hiermit als Referenz verwiesen.

In WO 97/6509 wird das Objekt mit einer periodischen Struktur (Sinus- oder Rechteckgitter) beleuchtet und mittels einer Kamera ein Bild des Objektes aufgenommen, digitalisiert und in
30 einem Speicher abgespeichert. Anschließend wird die periodische Struktur innerhalb der Bildebene so verschoben, dass die Phasenlage der Struktur geändert wird, und wieder ein Bild aufgenommen und abgespeichert. Dieser Vorgang (Verschiebung, Bildaufnahme, Abspeicherung) kann mehrfach wiederholt werden. Anschließend werden die Bilder

miteinander verrechnet um ein Schnittbild zu erzeugen. Als mathematischer Ansatz wird dabei eine Fourierentwicklung angegeben, was zu einem komplizierten Formelapparat führt. In WO 98/45745 wird eine einfachere Formel für die Schnittbilder angegeben, welche sich durch Vereinfachung des Ansatzes aus WO 97/6509 für den Falls jeweils gleicher

5 Phasenverschiebungen zwischen den einzelnen Aufnahmen herleiten lässt.

Die Realisierung der für die Anwendung der angegebenen Verfahren notwendigen physikalischen Randbedingungen erweist sich in der Praxis als sehr schwierig. So führt z. B. die Schwankung der Lampenhelligkeit zwischen den verschiedenen Aufnahmen zu streifenförmigen Artefakten in den generierten Schnittbildern. Bei Fluoreszenzobjekten treten

10 zusätzliche Probleme durch die zeitabhängige Ausbleichung der Fluoreszenzfarbstoffe auf, welche gleichfalls zu Fehlern führt. Auch die notwendige Konstanz der einzelnen Phasenverschiebungsschritte lässt sich in der Praxis nicht einhalten.

In WO 02/12945 wird daher vorgeschlagen, mittels Auskopplung eines Teils des zur Beleuchtung des Objekts dienenden Lichtes, Registrierung der Intensität und anschließende

15 Normierung der Einzelaufnahmen den Einfluss der zeitlich unterschiedlichen Lampenhelligkeit auszugleichen. Für die Berücksichtigung ungleicher Phasenverschiebungsschritte wird ein Gleichungssystem (dort Gl. 22) angegeben. Zum Ausgleich der Ausbleichung wird vorgeschlagen, statt der mindestens notwendigen drei Aufnahmen je Schnittbild 6 Aufnahmen in der Reihenfolge 1 – 2 – 3 – 3 – 2 – 1 zu

20 registrieren, zwei Schnittbilder (aus 1 – 2 – 3 und 3 – 2 – 1) zu berechnen und von diesen beiden den Mittelwert zu bestimmen.

Die Realisierung dieser Vorschläge erfordert erheblichen instrumentellen Aufwand.

Außerdem verlängert die Aufnahme zusätzlicher Bilder die notwendige Aufnahmezeit und erhöht damit auch die Belastung der Probe durch Beleuchtung mit dem

25 Fluoreszenzanregungslicht.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung optischer Schnittbilder anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optisch abbildender Systeme gemäß dem Hauptanspruch gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in

30 den Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Figuren näher beschrieben.

Es zeigen:

Fig. 1 den prinzipiellen Aufbau eines Mikroskops mit strukturierter Beleuchtung

Fig. 2 eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Bandpassfilter in der Fourierebene

Fig. 3 schematisch die Lage der Abbildungen der periodischen Struktur

Fig. 4 einen Ablaufplan für die Bestimmung der Korrekturwerte durch lineare Optimierung.

5

In Fig.1 ist das vereinfachte optische Schema der strukturierten Beleuchtung am Beispiel der Durchlichtbeleuchtung dargestellt. Eingezeichnet ist der bildgebende Strahlengang (Lukenstrahlengang). Eine 1-dimensionale periodische Struktur (Transmissionsgitter) (3), welche sich in einer Schärfeebene der dargestellten optischen Anordnung befindet, wird durch eine Lichtquelle (1) und nachfolgender Kollektoroptik (2) beleuchtet. Dem Gitter folgt in Lichtrichtung eine planparallele Glasplatte (4). Der Winkel der planparallelen Platte zur optischen Achse kann definiert eingestellt werden. Durch die nachfolgende beleuchtungsseitigen Optiken (5, 6) (Kondensor) wird die Struktur in die Präparatebene (7) abgebildet. Von dem Präparat ausgehendes Licht wird wiederum über ein Linsenpaar (8, 9) (Objektiv und Tubuslinse) in die darauffolgende Schärfenebene (10) abgebildet, in welcher z. B. eine CCD-Matrix einer digitalen Kamera angeordnet sein kann. Dabei dient die planparallele Glasplatte (4) durch definierte Verkipfung zur Verschiebung der Abbildung der Gitterstruktur (3) auf das in der Präparatebene (7) befindliche Objekt. Vorzugsweise dient im Fall der Auflicht-Fluoreszenz-Beobachtung das Objektiv (8) gleichzeitig als Kondensor.

10 Wie in WO 02/12945 beschrieben wurde werden jetzt mit mindestens 3 Stellungen der Glasplatte (4) mittels der digitalen Kamera jeweils eine Registrierung der sich ergebenden Helligkeitsverteilung im Objekt durchgeführt.

Dabei kann die Helligkeitsverteilung $I_i(x, y)$ für den Fall eines Sinus/Kosinus-Gitters vereinfacht durch die Formel

25

$$I_i(x, y) = I_0(x, y) \cdot (1 + m(x, y) \cdot \cos(\phi_0(x, y) + \phi_i(x, y))) \quad (1)$$

angegeben werden, wobei $i=0 \dots N-1$ die i -te Phasenposition des projizierten Gitters und N die Anzahl der Registrierungen ist, $m(x, y)$ die Modulationstiefe des Objekts (und damit die gesuchte Bildinformation an der Stelle x, y) ist und die ϕ_i die Phasenwerte sind.

30

Diese Gleichung enthält die drei unbekannten Größen I_0 , m und ϕ_0 . Somit kann durch mindestens drei Messungen bei gezielt variiertem ϕ_i ($i = 1, 2, 3$) die Bestimmung dieser Größen erfolgen. Die Lösung kann durch einen kleinste-Quadrate-Ansatz aus den Messungen

gewonnen werden. Dazu bietet es sich an, Gleichung (1) in einer kompakteren Form darzustellen und die Cosinus-Funktion mittels Additionstheorem umzuschreiben:

$$I(x, y, \phi_i) = a_0(x, y) + a_1(x, y) \cdot f_1(\phi_i) + a_2(x, y) \cdot f_2(\phi_i) \quad (2)$$

5

mit

$$f_1(\phi_i) = \cos \phi_i$$

$$f_2(\phi_i) = \sin \phi_i$$

$$a_0(x, y) = I_0(x, y)$$

$$a_1(x, y) = I_0(x, y) \cdot m(x, y) \cdot \cos \phi_0(x, y)$$

$$a_2(x, y) = -I_0(x, y) \cdot m(x, y) \cdot \sin \phi_0(x, y)$$

- 10 Die Funktionen f_1 und f_2 hängen somit nur von den im Prinzip frei zu wählenden Phasenverschiebungen ϕ_i ab. Für den Fall nichtsinusförmiger, aber periodischer Struktur kann die Helligkeitsverteilung $I_1(x, y)$ auch durch Reihenentwicklung approximiert werden, das Prinzip der Rechnung bleibt dabei im Grunde gleich. Die kleinste-Quadrate-Lösung lautet in Matrixschreibweise

15

$$\hat{M} \cdot \vec{a} = b \quad (3)$$

mit

$$20 \quad \hat{M} = \begin{pmatrix} N & \sum_N f_1(\phi_i) & \sum_N f_2(\phi_i) \\ \sum_N f_1(\phi_i) & \sum_N f_1^2(\phi_i) & \sum_N f_1(\phi_i) f_2(\phi_i) \\ \sum_N f_2(\phi_i) & \sum_N f_1(\phi_i) f_2(\phi_i) & \sum_N f_2^2(\phi_i) \end{pmatrix} \quad (4)$$

mit N = Anzahl Messungen (hier: Phasenschritte) und

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix} \quad (5)$$

25

sowie

$$\vec{b} = \begin{pmatrix} \sum_N I(x, y, \phi_i) \\ \sum_N [I(x, y, \phi_i) \cdot f_1(\phi_i)] \\ \sum_N [I(x, y, \phi_i) \cdot f_2(\phi_i)] \end{pmatrix} \quad (6)$$

- 5 Die Lösung dieser Matrixgleichung wird mathematisch durch invertieren der Matrix M gewonnen.

$$\begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix} = \hat{M}^{-1} \cdot \vec{b} \quad (7)$$

- 10 Somit können aus den Messungen, dargestellt durch den Vektor b , und den Phasenverschiebungen des Gitters die gesuchten unbekannten Größen ermittelt werden. Insbesondere ergibt sich die Modulationstiefe am Ort (x, y) zu

$$m(x, y) = \frac{\sqrt{a_1^2(x, y) + a_2^2(x, y)}}{a_0(x, y)} \quad (8)$$

15

Da mit Defokussierung des Objektes der Gitterkontrast und damit zwangsläufig die Modulationstiefe im Objekt abnimmt, stellt Gleichung (8) eine Bestimmungsgleichung zum Erhalt eines tiefendiskriminierten Bildes (optischer Schnitt) dar. Gleichungen (2) und (3) liefern einen universalen Lösungsweg, der die Anpassung der Phasenlagen ϕ_i an die jeweils experimentellen Gegebenheiten erlaubt. So ist etwa die Wahl der Zahl der Schritte und die Positionen im Objektraum (Ort der abgebildeten Gitterlinien) frei wählbar.

20

Jedes optische System überträgt gemäß seiner optischen Transferfunktion Raumfrequenzen bis zu einem Grenzwert, der durch die numerische Apertur NA der Optik und der

- 25 Lichtwellenlänge λ bestimmt ist:

$$k_{\max} = \frac{4\pi NA}{\lambda}$$

Dies hat zur Folge, dass von einem in den Objektraum abgebildeten Gitter, welches kein reines Sinus-Gitter ist, die höheren Harmonischen der Gitterperiode bis zu eben dieser Grenzfrequenz k_{\max} übertragen werden und sich in dem Fourier-transformierten Bild des Objektes als lokale Maxima wiederfinden. Auch in einem nach dem oben angeführten Schema ermittelten Schnittbild sind diese Komponenten des Gitters enthalten und resultieren in Streifenartefakten. Diese Artefakte sind dadurch eliminierbar, dass die Harmonischen des projizierten Gitters durch Fourier-Transformation im Raumfrequenzspektrum lokalisiert und durch gezieltes Setzen von Filtern (Bandpass-Filter, Bandstops) entfernt werden. Eine anschließende Rücktransformation führt dann zu artefaktfreie Bildern. Diese Methode ist schematisch in Fig. 2 dargestellt. In der Fourierebene (11) sind mit (12) die höheren Harmonischen der Gitterstruktur (3) bezeichnet, (13) bezeichnet den Nullpunkt und entspricht dem Gleichanteil der Beleuchtung, d.h. einer gleichmäßigen, nicht strukturierten Beleuchtung. Durch Einbringen den Harmonischen (12) entsprechender Bandpass-Filter in den Strahlengang tragen diese Bereiche nicht zur Abbildung bei und werden damit nicht von der digitalen Kamera registriert.

Bei fluoreszierenden Objekten tritt ein weiterer Grund zum Auftreten von Streifenartefakten hervor, nämlich das Fluoreszenz-Bleichen (photobleaching, fluorescence fading). Hierbei kommt es durch die Abbildung der Struktur (z.B. des Gitters) in das Objekt zu Regionen unterschiedlich starker Ausbleichung der Fluoreszenz und somit schließlich zu Streifenartefakten in jedem in der Folge aufgenommenem Bild. Die Frequenzanteile der Artefakte im Spektrum eines solchen Bildes sind besonders stark bei der Grundfrequenz der projizierten Struktur. Durch Entfernen der Raumfrequenzanteile der projizierten Struktur im Fourier-transformierten Bild durch entsprechende Bandpass-Filter und anschließender Rücktransformation kann auch hier prinzipiell ein artefaktfreies Bild erzeugt werden.

Die Verhinderung von diesen bei der Fluoreszenzbeleuchtung auftretenden Artefakten kann auch durch die Bestimmung und Ausnutzung der Bleicheigenschaften von fluoreszierenden Objekten bei der sequentiellen Aufnahme von Bildern desselben Objekts erreicht werden. Hierbei ergibt sich pro Bildaufnahme durch die Beleuchtung eine Bleichung des Objekts an den beleuchteten Stellen. Die Stärke des Bleichens hängt neben der Beleuchtungsintensität von den photochemischen und photophysikalischen Eigenschaften des fluoreszierenden Objektes ab. Die Bestimmung der Fluoreszenzstärke des Objektes durch Integration der Intensitäten über alle oder ausgewählte Objektorte (x , y) ermöglicht die Reskalierung der

Bildsequenz nach erfolgter Aufnahme der Bilder. Dazu werden entweder über analoger Kamera und Analog-Digital-Wandler oder einer CCD-Kamera in einem Computer gespeicherten Bildinformationen durch paarweise Ermittlung von Quotienten der Fluoreszenzstärken der Bilder die Intensitäten an den Bildorten (x,y) auf einen Maximalwert normiert. Somit lässt sich der Fluoreszenzverlust durch Fluoreszenzbleichen berücksichtigen. Dazu können nach Fig. 3 Regions of Interest (ROI) definiert werden, die bei beiden Bildaufnahmen gleichermaßen beleuchtet werden und in Folge fluoreszieren, das Maß der Abnahme der Fluoreszenz in diesen Bereichen ist ein Maß für die Bleich-Rate und kann damit für die Normierung der verschiedenen Registrierungen der Helligkeitsverteilung herangezogen werden. Die Definition dieser ROIs kann dabei sowohl vom Benutzer über entsprechende Eingabemittel als auch automatisch (aus der jeweiligen Lage der abgebildeten Struktur) erfolgen. In Fig. 3 stellt (14) die Verhältnisse bei einer ersten Registrierung der Helligkeitsverteilung auf dem Objekt dar, (15) die Verhältnisse bei einer zweiten Registrierung mit veränderter Phasenlage der abgebildeten Struktur (16). Die Regions of Interest (17) werden vorteilhafterweise so definiert, dass in beiden Registrierungen gleichmäßige Beleuchtung erfolgt.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Bestimmung von optischen Schnittbildern praktisch für beliebig gewählte Phasenverschiebungen ϕ_1 . Zur Verhinderung von Fehlern sind die Phasenverschiebungen ϕ_1 mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Dieses lässt sich in einfacher Weise mit dem im folgenden beschriebenen Kalibrierungsverfahren sichern, bei dem die Einflüsse des gesamten Systems berücksichtigt werden.

Dazu wird zunächst ein Referenzbild (Objekt mit überlagertem Gitter) aufgenommen und registriert. Daraufhin erfolgt eine geringe Phasenverschiebung des Gitters auf eine zunächst unbekannte Phasenlage des Gitters (es soll diese „Verschiebung pro Ansteuerungssignal“ erst kalibriert werden) und erneute Bildaufnahme. Die erhaltenen zwei Bilder werden nun rechnerisch verglichen. Dies kann ohne Einschränkung der Allgemeinheit durch Differenzbildung, Summierung oder jede andere Art erfolgen, die auf eine Merit-Funktion führt. Resultat ist zunächst im Allgemeinen ein Streifen-behaftetes Bild. Die Schritte: Verschiebung des Gitters um einen kleinen Betrag, Bildaufnahme, Vergleich mit dem Referenzbild werden so lange wiederholt, bis die Merit-Funktion den Extremwert erreicht, also z.B. ein Differenzbild nur noch aus Untergrundrauschen besteht oder ein Summenbild maximale Werte erreicht. Ist letzteres erfüllt, ist die Kalibration abgeschlossen und ein so erhaltener Ansteuerwert kann in einem Speichermedium zum späteren Zweck abrufbar

gehalten werden. Dieser Wert entspricht damit genau der Verschiebung des Gitters um eine volle Periode. Alternativ ist es auch möglich, ein Summenbild auf gleichmäßige Helligkeitsverteilung (d.h. Verschwinden der Streifenstruktur) zu bewerten. In diesem Fall entspricht dieser Wert dann der Verschiebung des Gitters um eine halbe Periode.

- 5 Vorzugsweise wird diese Prozedur mit einem Spiegel als Objekt durchgeführt. Der beschriebene Vorgang kann sowohl manuell als auch automatisiert erfolgen.

- Im folgenden wird an Hand der Fig. 4 ein alternatives Verfahren zur Bestimmung der Einflüsse von Lampenhelligkeitsschwankungen, Ausbleichen des Objektes bei
10 Fluoreszenzbeleuchtung und nicht-sinusförmigem Gitter beschrieben.

- Dazu wird die zeitliche Veränderung der Beleuchtung durch intensitätsproportionale skalare Faktoren $\theta_i > 0$ beschrieben werden, welche bei jeder aufeinanderfolgenden Aufnahme berücksichtigt werden (die Abhängigkeit der Größen g_i, o_i , usw. vom Ort (x,y) wird im
15 Folgenden zur Vereinfachung nicht mehr explizit angegeben):

$$g_i = \theta_i o_i \quad (9)$$

Die modellierte Beobachtung g_i ergibt sich nun aus dem Produkt mit dem idealen, konsistenten Phasenbild o_i . Um vollständig ein gestörtes System zu beschreiben, braucht man nur $N-1$ Faktoren θ_i zu bestimmen.

20

Das Ausbleichen des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung wirkt in Abhängigkeit von der einwirkenden Strahlungsintensität über die Zeit. Diese ist wegen des projizierten Gitters örtlich verschieden und erfordert deshalb eine Behandlung, die die Gitterfunktion berücksichtigt. Eine einfache Beschreibung wird möglich, wenn man das Ausbleichen als eine
25 lineare Funktion der Beleuchtungsintensität annimmt:

$$k_i = (1 - d \cdot o_{i-1} k_{i-1}) \prod_{j=0}^{i-1} k_j, \quad i \geq 1 \quad \text{mit } k_0 = 1 \quad (10)$$

- Der aus ortsvarianten Faktoren bestehende Vektor $0 < k_i \leq 1$ soll abhängig vom Verlauf der Bestrahlungsintensität und einem wählbaren Maß $1 > d \geq 0$ für das Ausbleichen die Abschwächung beschreiben wenn man ihn komponentenweise mit den jeweils noch nicht
30 ausgebleichenen Beobachtungen o_i multipliziert:

$$g_i = o_i k_i \quad (11)$$

Aus (10) geht hervor, dass immer jede Beobachtung mit den Faktoren aller vorhergehenden Phasenaufnahmen multipliziert wird, diese sind bereits z.T. ausgebleichen und überlappen sich

mit der momentanen Phase. Alternativ kann man k_i auch exponentiell d.h. entsprechend der Abklingkurve eines bestimmten Fluorochromes beschreiben.

- 5 Nichtsinusförmige Gitterverläufe verursachen Streifenartefakte insbesondere für ganzzahlige Vielfache der Gitterfrequenz. Unter genauer Kenntnis von Frequenz, Phasenlage und Kurvenform des Gitters bei den einzelnen Aufnahmen wird es möglich einen sinusförmigen Verlauf zu erzeugen. Ein Korrekturvektor I_{Korr} , ähnlich wie unter (10), hier jedoch entlang der Gitterperiodizität, soll unter (12) betrachtet werden.

$$I_{Korr} = \frac{f_{Sinus}}{f_{Gitter} + s} \quad (12)$$

- 10 Die Nachbildung der observierten Gitterfunktion ist mit f_{Gitter} gekennzeichnet. Ein ideal sinusförmiger Intensitätsverlauf wird mit f_{Sinus} zum Ausdruck gebracht. Die Konstante s im Nenner soll die Division durch sehr kleine Werte von f_{Gitter} übernehmen. Die Nachbildung der observierten Gitterfunktion kann auf verschiedenen Wegen geschehen. Eine einfache Möglichkeit einer Approximation bietet sich z.B. durch die Verwendung einer Fourierreihe für die Trapezfunktion an.

$$f_{Gitter}(x; b) = \frac{1}{2} + \frac{2}{b\pi} \sum_{i=1}^M \frac{\sin(2bi - b)}{(2i - 1)^2} \sin(2xi - x) \quad (13)$$

- Mit b kann man die Flankensteilheit der Trapezübergänge variieren, x ist die Ortskoordinate und M die Anzahl der benutzten Fourierkoeffizienten. Alternativ lassen sich auch genauere Modelle verwenden. Diese erfordern die Faltung der wahren Gitterfunktion mit einer lateralen Komponente der PSF des Mikroskops. Von entscheidender Bedeutung ist eine phasen- und frequenzsynchrone Synthetisierung des Korrekturvektors I_{Korr} . Ist dies gewährleistet, so kann ähnlich wie unter (11) mit einer einfachen komponentenweisen Multiplikation ein korrigiertes Ergebnis für die Observation erzielt werden.

$$g_{IKorr} = g_i I_{IKorr} \quad (14)$$

- 25 Die korrigierten Phasenbilder erhält man nun aus:

$$I_i = o_i = \frac{g_i I_{IKorr}}{k_i \theta_i}, \text{ mit } \theta_i > 0 \cap k_i > 0 \quad (15)$$

Durch Einsetzen von (15) in Gleichung (3) bzw. (8) erhält man eine allgemeine Formel zur Rekonstruktion, welche außerdem die Parameter θ_i , d und b enthält.

- 30 Die Lösung des gestellten Problems kann beispielsweise durch Umformung in eine Extremalaufgabe erfolgen. Mit den Hilfsmitteln numerischer Optimierung kann man die Parameter θ_i , d und b unter Zuhilfenahme einer Merit-Funktion bestimmen.

$$M(\theta_i; d; b) = \alpha_0 |F\{\bar{a}\}_0|^2 + \alpha_1 |F\{\bar{a}\}_w|^2 + \alpha_2 |F\{\bar{a}\}_{2w}|^2 + \dots + \alpha_n |F\{\bar{a}\}_{nw}|^2 \rightarrow \min \quad (16)$$

Hierbei ist $F\{a\}_w$ eine Komponente der Fourier-Transformation des Resultatsvektors a aus Gleichung (5). Dabei sind neben der Fourier-Transformation auch andere

5 Funktionaltransformationen geeignet.

Dabei ist die Meritfunktion (Gleichung (16)) hier nur beispielsweise genannt, es sind auch andere Meritfunktionen anwendbar.

Ziel ist es θ_i , d und b so zu variieren, dass (16) minimiert wird. Dafür bietet sich eine Vielzahl von Methoden an die keinesfalls eingeschränkt zu Gradienten- oder

10 Liniensuchmethoden zu sehen sind. Jeder Transformationskoeffizient ist außerdem gewichtet mit einem Koeffizienten α_i . Damit kann der Algorithmus an verschiedene Signal-Rausch Abstände oder bevorzugte Frequenzen angepasst werden. Ein diesbezüglich vorteilhafter Wert den Gleichanteil zu wichten ergibt sich mit folgender Beziehung:

$$15 \quad \alpha_0 \propto \frac{|F\{\bar{a}\}_1|^2 + |F\{\bar{a}\}_2|^2 + \dots + |F\{\bar{a}\}_n|^2}{|F\{\bar{a}\}_0|^2} \quad (17)$$

Die allgemeine Funktionsweise des hier beschriebenen Korrekturapparates ist dem schematischen Ablaufplan in Fig. 4 zu entnehmen. Die Verwendung von Projektionen ist vorteilhaft um effizient die Parameter θ_i , d und b zu bestimmen. Die Parameterermittlung ist aber nicht auf diesen eindimensionalen Fall eingeschränkt, sondern funktioniert in der Ebene

20 in analoger Weise.

Es werden bei fester Fokusslage von der Kamera mindestens drei Helligkeitsverteilungen (18), (19), (20), ggf. auch mehr (21), mit verschiedenen Phasenlagen $i=1, 2, 3, \dots, N$ der auf das Objekt abgebildeten Gitterstruktur registriert. Mittels Projektion werden diese 2-dimensionalen Helligkeitsverteilungen jeweils in eine 1-dimensionale Verteilung (22), (23),

25 (24), und ggf. (25) überführt. Mit Anfangswerten für die Parameter θ_i , d und b werden nach Formel (15) korrigierte Phasenbilder berechnet und aus diesen mittels des Ansatzes aus Formel (3) ein erstes Bild des optischen Schnitts errechnet (26). Die Anfangswerte der Parameter θ_i , d und b können dabei vom Bediener eingegeben oder auch automatisch geschätzt werden. Für diese Schätzung können bekannten Tools der Minimierung /

30 Maximierung einer Merit-Funktion benutzt werden (z. B. Simplex, Marquardt, o.a.). Aus diesem Ergebnis wird nun in (27) die Merit-Funktion nach Formel (16) bestimmt und in (28) auf das Erreichen eines Minimums getestet. Ist das Minimum noch nicht erreicht wird eine

neue Schätzung der Parameter θ_i , d und b durchgeführt (29) und mit (26) fortgesetzt. Für den Fall des Erreichens des Minimums der Merit-Funktion, d.h. weitere Variation der Parameter θ_i , d und b lassen ihren Wert wieder ansteigen, sind die optimalen Parameter bestimmt und in (30) wird das optische Schnittbild mittels der Formeln (15), (3) und (8) bestimmt und in

- 5 (31) ausgegeben. Anschließend kann die Fokusslage verändert werden und nach dem dargestellten Verfahren ein weiteres optisches Schnittbild bestimmt werden usw.. Durch dieses Abrastern des Objektes in z-Richtung lässt sich ein z-Stapel von Schnittbildern und damit eine dreidimensionale Darstellung des Objekts generieren.

- Ein anderer Ansatz zur Berücksichtigung von Ausbleicherscheinungen des Objekts bei der
10 Fluoreszenzbeleuchtung beruht auf der Bestimmung einer lokalen Korrekturfunktion. Dazu wird eine Korrekturfunktion $\kappa_i(x)$

$$\kappa_i(x) = \frac{\int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} g_i(\xi) d\xi}{\int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} g_i(\xi) d\xi} \quad (18)$$

- angenommen, deren lokaler Wert über eine Gitterperiode $\tau = 2\pi / \omega$ gebildet wird. Der Ansatz dieser Funktion kann auch die Abhängigkeit von y , der hier zur Gitterperiode senkrecht
15 angenommen Koordinate berücksichtigen, was hier jedoch auch Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen wird. Unter Verwendung einer ortsvariablen Ausbleichfunktion $\theta_i(x)$ und durch geeignete Umformungen mit der Näherung (siehe auch Formel (1) und (9)) $g_i(x) = \theta_i(x) I_0(x) [1 + m \cos(\omega x + \varphi_i)]$, lässt sich zeigen

$$\kappa_i(x) = \frac{\int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} I_0(\xi) d\xi + m \int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} I_0(\xi) \cos(\omega \xi + \varphi_i) d\xi}{\int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} \theta_i(\xi) I_0(\xi) d\xi + m \int_{x-\tau/2}^{x+\tau/2} \theta_i(\xi) I_0(\xi) \cos(\omega \xi + \varphi_i) d\xi} \quad \text{dass bei gleichmässiger}$$

- 20 Ausbleichfunktion diese Korrekturfunktion proportional zu $1/\theta_i(x)$ wird.
Es hat sich gezeigt, dass es von Vorteil ist, wenn die Mittelwertbildung über mehr als eine Gitterperiode ausgeführt wird.
Weiterhin hat sich gezeigt, dass diese Korrekturfunktion in der Nähe von Kanten in der Ausbleichfunktion zu Überschwingen neigt und damit zusätzliche Verfälschungen des
25 Ergebnisses erzeugen kann. Um dem abzuweichen hat sich bewährt, das Auftreten des Überschwingens durch Vergleich mit einem Mittelwert zu erkennen und an diesen Stellen anstatt des verfälschten Wertes den aus den Formeln (9) und (16) vorher bestimmten globalen Wert $1/\theta_i$ einzusetzen.

Die entsprechende Formel lautet dann:

$$\kappa_i(x) = \begin{cases} \kappa_i(x) & \text{für } \left| \kappa_i(x) - \int_{x-\tau}^{x+\tau} \kappa_i(\xi) d\xi \right| < \varepsilon \\ 1/\theta_i & \text{ansonsten} \end{cases} \quad (19)$$

Dabei ist es vorteilhaft, die Schwelle ε als Prozentwert der Variation der lokalen Veränderlichkeit der Korrekturfunktion innerhalb des Bildes zu setzen, z.B. 5%. Anstatt von $1/\theta_i$ können auch interpolierte Werte von $\kappa_i(x)$, welche unterhalb der Schwelle im

5 zweidimensionalen Raum berechnet wurden, verwendet werden.

Dieses Verfahren berücksichtigt somit ortsabhängig schwankende Ausbleicherscheinungen z.B. aufgrund verschiedener Fluorophore oder schwankender Eigenschaften selbiger.

Die Realisierung der Erfindung ist nicht an die dargestellten Ausführungsbeispiele gebunden, durch fachmännische Weiterentwicklungen oder andere Ansätze zur Berücksichtigung der

10 Helligkeitsschwankungen der Lichtquelle oder des Ausbleichen des Objektes bei der Fluoreszenzbeleuchtung wird der Bereich der Erfindung nicht verlassen.

Ansprüche

1. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme bei dem
 - a) ein Objekt mit einer periodischen Struktur beleuchtet wird,
 - 5 b) eine Registrierung der so entstehenden Helligkeitsverteilung erfolgt,
 - c) die Phasenlage der periodischen Struktur verschoben wird,
 - d) die Schritte a) bis c) sooft wiederholt werden bis mindestens drei Helligkeitsverteilungen registriert wurden,
 - 10 e) die registrierten Helligkeitsverteilungen miteinander verrechnet werden um eine Objekthelligkeitsverteilung zu erhalten,
 - gekennzeichnet dadurch, dass
 - f) die Verschiebungen der Phasenlagen aus Schritt c) registriert werden,
 - g) Helligkeitsschwankungen der Beleuchtung erfasst werden
 - h) Ausbleicherscheinungen des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung bestimmt werden
 - 15 und die Verrechnung unter Berücksichtigung der in den Schritten f) bis h) gewonnenen Ergebnisse erfolgt.
2. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass Ausbleicherscheinungen des Objekts bei
20 Fluoreszenzbeleuchtung dadurch bestimmt werden, dass aus vorzugsweise aufeinanderfolgend registrierten Helligkeitsverteilungen Gebiete gleicher Beleuchtungsintensität bestimmt werden und die Helligkeit dieser Gebiete miteinander verglichen wird.
- 25 3. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, dass ein Normierungsfaktor durch eine Quotientenbildung aus den registrierten Helligkeiten der Gebiete gleicher Beleuchtungsintensität erfolgt und mit Hilfe dieses Normierungsfaktor die registrierten Helligkeitsverteilungen normiert werden.
30
4. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Bestimmung der Objekthelligkeitsverteilung $m(x, y)$ durch die Gleichung

$$m(x, y) = \frac{\sqrt{a_1^2(x, y) + a_2^2(x, y)}}{a_0(x, y)}$$

erfolgt, wobei die Bestimmung des Vektors

5

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} a_0(x, y) \\ a_1(x, y) \\ a_2(x, y) \end{pmatrix}$$

durch Lösen eines Gleichungssystems aus der Verknüpfung der registrierten Helligkeitsverteilungen $I_i(x, y, \phi_i)$ mit den registrierten Phasenverschiebungen ϕ_i erfolgt, wobei i für die Anzahl der Registrierungen der Helligkeitsverteilung steht.

10

5. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 3 und 4, gekennzeichnet dadurch, dass das Gleichungssystem die normierten Helligkeitsverteilungen mit den registrierten Phasenverschiebungen verknüpft.

15

6. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass eine Kalibrierung der Verschiebungen der Phasenlage erfolgt, wobei

20

a) ein Objekt, welches vorzugsweise eine Spiegelfläche ist, mit einer periodischen Struktur beleuchtet wird,

b) eine erste Helligkeitsverteilung registriert wird,

c) die Phasenlage der periodischen Struktur um einen bestimmten geringen Betrag verändert wird, welcher registriert wird,

d) eine zweite Helligkeitsverteilung registriert wird,

25

e) der Unterschied der beiden Helligkeitsverteilungen bestimmt und bzgl. streifenförmiger Verteilung bewertet wird,

f) die Schritte c) bis e) solange wiederholt werden, bis die Bewertung des Unterschiedes zwischen erster und folgender Helligkeitsverteilung auf ein Extremum führt, und

30

g) der so gefundenen Wert der Phasenlage der periodischen Struktur registriert wird.

7. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass durch nichtsinusförmige Verteilung der Beleuchtung des Objekts auftretende Fehler korrigiert werden.
- 5 8. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, dass mittels Bandpassfilter höhere Harmonische der Grundfrequenz der periodischen Struktur aus der Helligkeitsverteilung herausgefiltert werden.
- 10 9. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Verrechnung der registrierten Helligkeitsverteilungen unter Berücksichtigung von Korrekturwerten vorzugsweise für die Berücksichtigung der Helligkeitsschwankungen der Beleuchtung, des Ausbleichens des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung und nichtsinusförmiger
- 15 Verteilung der Beleuchtung des Objekts erfolgt, welche durch lineare Optimierung bestimmt werden.
10. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, dass die lineare Optimierung auf eine Merit-
- 20 Funktion der Form
- $$M(\theta_i; d; b) = \alpha_0 |F\{\vec{a}\}_0|^2 + \alpha_1 |F\{\vec{a}\}_w|^2 + \alpha_2 |F\{\vec{a}\}_{2w}|^2 + \dots + \alpha_n |F\{\vec{a}\}_{nw}|^2 \rightarrow \min$$
- angewandt wird, wobei $F\{a\}$ eine Funktionaltransformierte des Vektors a ist, θ_i skalare Faktoren zur Charakterisierung der Beleuchtungshelligkeitsschwankung ist, d ein Maß für das Ausbleichen des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung ist, b ein
- 25 Faktor zur Charakterisierung der nichtsinusförmigen Verteilung der Beleuchtung des Objekts ist und die α_i Gewichtungskoeffizienten zur Anpassung an die Aufnahmebedingungen vorzugsweise bzgl. verschiedener Signal-Rausch Abstände oder bevorzugter Frequenzen sind.
- 30 11. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass Ausbleicherscheinungen des Objekts bei Fluoreszenzbeleuchtung dadurch bestimmt werden, dass aus vorzugsweise aufeinanderfolgenden Helligkeitsregistrierungen eine lokale Korrekturfunktion bestimmt wird.

12. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 11, gekennzeichnet dadurch, dass diese lokale Korrekturfunktion durch Mittelung über mindestens eine Periode der periodischen Beleuchtungsstruktur bestimmt wird.

5

13. Verfahren zur Verbesserung der Tiefendiskriminierung optischer Systeme nach Anspruch 11, gekennzeichnet dadurch, dass in der Nähe von im Objekt enthaltenen Kanten der Ausbleichfunktion auftretendes Überschwingungen der berechneten lokalen Korrekturfunktion durch Ersetzen mit einem Schätzwert verhindert wird.

10

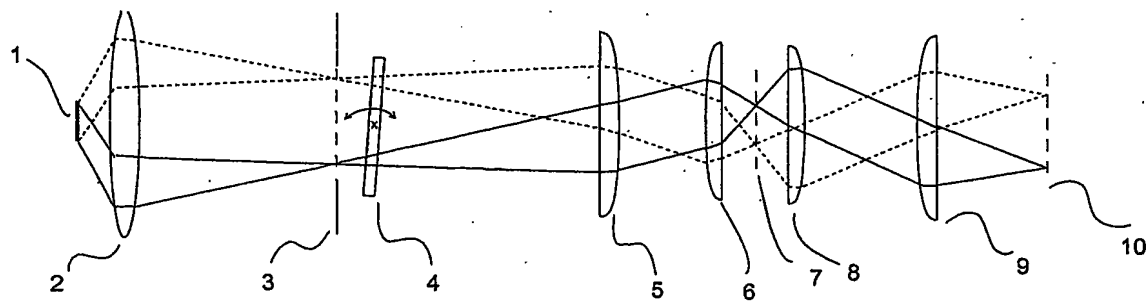


Fig. 1

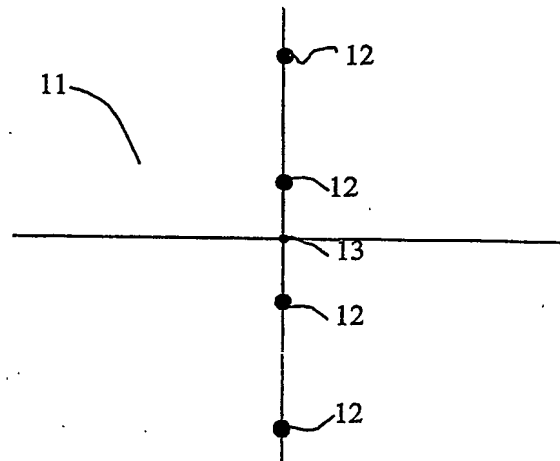
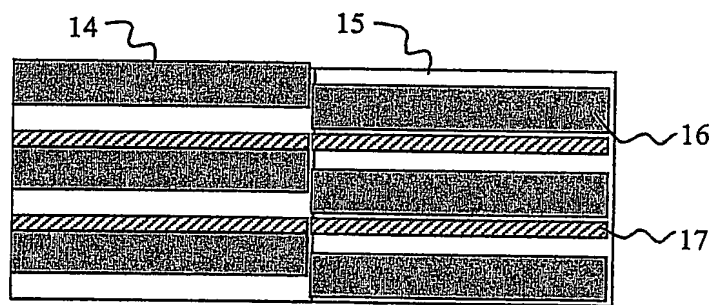


Fig. 2



 Region Of Interest
 Gitterlinien

Fig. 3

HA7611

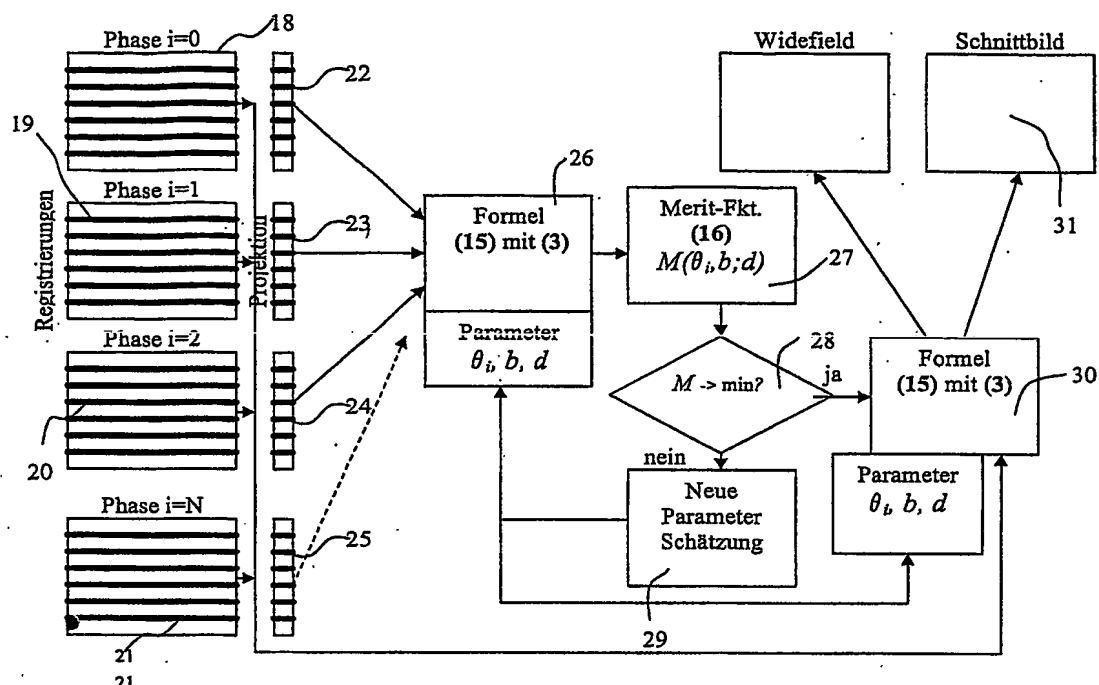


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 03/11927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 12945 A (HECHT FRANK ; LANGE RALPH (DE); BLOOS HELMUT (DE); GERSTNER VOLKER) 14 February 2002 (2002-02-14) cited in the application	1, 4, 7-9
Y	page 2 -page 12 figures 1, 3, 6	2, 3, 5, 11
Y	EP 1 235 424 A (ZEISS CARL ; ZEISS STIFTUNG (DE)) 28 August 2002 (2002-08-28) paragraph '0010! - paragraph '0015! figure 3	2, 3, 5, 11
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ; FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20 February 1997 (1997-02-20) cited in the application page 13, line 14 -page 23, line 2	1, 4, 6-8
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2004

Date of mailing of the international search report

27/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Windecker, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 02/P 03/11927

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HANLEY Q S ET AL: "SPECTRAL IMAGING IN A PROGRAMMABLE ARRAY MICROSCOPE BY HADAMARD TRANSFORM FLUORESCENCE SPECTROSCOPY" APPLIED SPECTROSCOPY, THE SOCIETY FOR APPLIED SPECTROSCOPY. BALTIMORE, US, vol. 53, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 1-10, XP000822234 ISSN: 0003-7028 the whole document</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/03/11927

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0212945	A	14-02-2002	DE 10038527 A1	21-02-2002
			WO 0212945 A2	14-02-2002
			EP 1307774 A2	07-05-2003
			US 2003086067 A1	08-05-2003
EP 1235424	A	28-08-2002	DE 10109130 A1	05-09-2002
			EP 1235424 A2	28-08-2002
			US 2002176007 A1	28-11-2002
WO 9706509	A	20-02-1997	US 5867604 A	02-02-1999
			AU 6680296 A	05-03-1997
			DE 69620613 D1	16-05-2002
			DE 69620613 T2	21-11-2002
			EP 0842497 A1	20-05-1998
			WO 9706509 A1	20-02-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PC 03/11927

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 12945 A (HECHT FRANK ; LANGE RALPH (DE); BLOOS HELMUT (DE); GERSTNER VOLKER) 14. Februar 2002 (2002-02-14) in der Anmeldung erwähnt	1, 4, 7-9
Y	Seite 2 -Seite 12 Abbildungen 1, 3, 6	2, 3, 5, 11
Y	EP 1 235 424 A (ZEISS CARL ; ZEISS STIFTUNG (DE)) 28. August 2002 (2002-08-28) Absatz '0010! - Absatz '0015! Abbildung 3	2, 3, 5, 11
A	WO 97 06509 A (GIM SYSTEMS LTD ; FRIEDMAN MARK M (IL); BEN LEVY MEIR (IL); PELEC E) 20. Februar 1997 (1997-02-20) in der Anmeldung erwähnt Seite 13, Zeile 14 -Seite 23, Zeile 2	1, 4, 6-8
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

19. Februar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Windecker, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HANLEY Q S ET AL: "SPECTRAL IMAGING IN A PROGRAMMABLE ARRAY MICROSCOPE BY HADAMARD TRANSFORM FLUORESCENCE SPECTROSCOPY" APPLIED SPECTROSCOPY, THE SOCIETY FOR APPLIED SPECTROSCOPY. BALTIMORE, US, Bd. 53, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 1-10, XP000822234 ISSN: 0003-7028 das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/11927

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0212945 A	14-02-2002	DE 10038527 A1	21-02-2002
		WO 0212945 A2	14-02-2002
		EP 1307774 A2	07-05-2003
		US 2003086067 A1	08-05-2003
EP 1235424 A	28-08-2002	DE 10109130 A1	05-09-2002
		EP 1235424 A2	28-08-2002
		US 2002176007 A1	28-11-2002
WO 9706509 A	20-02-1997	US 5867604 A	02-02-1999
		AU 6680296 A	05-03-1997
		DE 69620613 D1	16-05-2002
		DE 69620613 T2	21-11-2002
		EP 0842497 A1	20-05-1998
		WO 9706509 A1	20-02-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.